



TITLE:

# ウレアーゼ阻害剤による尿路結石の予防 第2報: ヒドロキサム酸の尿中排泄とラット膀胱結石の形成防止効果

AUTHOR(S):

竹内, 秀雄; 吉田, 修; 小橋, 恭一; 竹部, 幸子; 長谷, 純  
—

CITATION:

竹内, 秀雄 ...[et al]. ウレアーゼ阻害剤による尿路結石の予防 第2報: ヒドロキサム酸の尿中排泄とラット膀胱結石の形成防止効果. 泌尿器科紀要 1977, 23(2): 113-118

ISSUE DATE:

1977-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/122065>

RIGHT:

## ウレアーゼ阻害剤による尿路結石の予防

第2報 ヒドロキサム酸の尿中排泄とラット  
膀胱結石の形成防止効果

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

竹 内 秀 雄  
吉 田 修

富山大学薬学部薬品生物化学教室（主任：長谷純一教授）

小 橋 恭 一  
竹 部 幸 子  
長 谷 純 一PREVENTION OF INFECTED URINARY STONES  
BY UREASE INHIBITORII. URINARY EXCRETION OF HYDROXAMIC ACIDS AND  
PREVENTION OF INFECTED BLADDER  
STONES IN RATS

Hideo TAKEUCHI and Osamu YOSHIDA

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University  
(Chairman: Prof. O. Yoshida, M. D.)*

Kyoichi KOBASHI, Sachiko TAKEBE and Jun'ichi HASE

*Faculty of Pharmaceutical Science, University of Toyama*

Phosphatic stones, particularly struvite stones, are thought to develop in the urinary tract infected by urea splitting microorganism.

The hydroxamic acid is known to be a specific and effective inhibitor of bacterial urease.

Urinary excretion of several hydroxamic acid derivatives was investigated after oral administration to the experimental rats.

Approximately 30% of acetohydroxamic acid was excreted in urine unchanged for 24 hours after administration. 24 hour excretions of other hydroxamic acids were as follows: serine-9%, histidine-3.4%, nicotino-1.0%, caplyro-1.0%, glycine-0.9% and benzo-0.6%.

Effective index (=recovery %/I<sub>50</sub> (μM)) of acetohydroxamic acid was 3.05 and that of nicotino-hydroxamic acid was 0.50.

Teratogenic action of acetohydroxamic acid in rats had been reported, but that of nicotino-hydroxamic acid was not reported yet.

Administration of nicotino-hydroxamic acid to rats with urinary tract infection caused by *Proteus mirabilis* significantly prevented alkalization of urine as well as bladder stone formation. The extent of pyelonephritis and azotemia was much less than that in the untreated control animals.

The hydroxamic acid derivatives more potent than nicotino-hydroxamic acid will become useful drugs for the prevention of struvite stones.

## 緒 言

尿路結石のうちでリン酸塩結石の形成には尿 pH 上昇が重要な要因になっている。尿 pH 上昇は尿路感染がある場合にたびたび認められるが、これは尿素分解細菌によりアンモニアが生成されるためである。とくにリン酸マグネシウムアンモン結石の場合アンモニア濃度の上昇が重要な要因となっている。したがってリン酸塩結石の予防には感染の抑制が重要であるが、変形菌・緑膿菌などの尿素分解細菌は化学療法剤に抵抗性を有することが多く、結石の増大再発をきたしやすい。

そこでわれわれはウレアーゼの特異的阻害剤であるヒドロキサム酸<sup>1)</sup>による尿路結石形成の防止効果を検討した。in vitro におけるニコチノヒドロキサム酸の尿 pH 上昇抑制効果はすでに報告したが<sup>2)</sup>、今回各種ヒドロキサム酸の尿中排泄率について調査し、その中からニコチノヒドロキサム酸を選び、経口投与による実験的ラット膀胱結石の形成抑制効果を検討したので報告する。

## 実 験 方 法

### I. ヒドロキサム酸の尿中排泄

使用したヒドロキサム酸のうちニコチノヒドロキサム酸 (mp 168°C), ベンゾヒドロキサム酸 (mp 125°C), カプリロヒドロキサム酸 (mp 79°C), アセトヒドロキサム酸 (mp 88°C) は富山大学薬学部において合成した。アミノ酸のヒドロキサム酸誘導体は田辺製薬千畑一郎博士より分与された。各ヒドロキサム酸は水または希アルカリ水に溶解した。

18時間前後絶食したラット (Wistar 系雌 100~200 g) に各種ヒドロキサム酸 100 mg/kg (ただし水に溶けがたい化合物については 40~50mg/kg) を胃ゾンデにて強制経口投与した。ラットは実験中絶食自由摂水とした。ヒドロキサム酸投与後代謝ケージ中にて6時間および24時間の尿を採取した。ケージ中の付着尿は蒸留水にてよく洗浄して集めた。集めた尿中のヒドロキサム酸量はウレアーゼ法<sup>3)</sup>により定量し、未変化ヒドロキサム酸として投与量に対する回収率を求めた。また対照ラット尿中には全くウレアーゼ阻害性物質は含まれていなかった。

### II. ニコチノヒドロキサム酸の経口投与によるラット膀胱結石の形成抑制

ラットの膀胱内に *Proteus mirabilis* 付着の亜鉛玉を挿入すると術後1週には相当量の異物結石が形成される (Fig. 1)。また同時に腎の感染もたびたび認められ

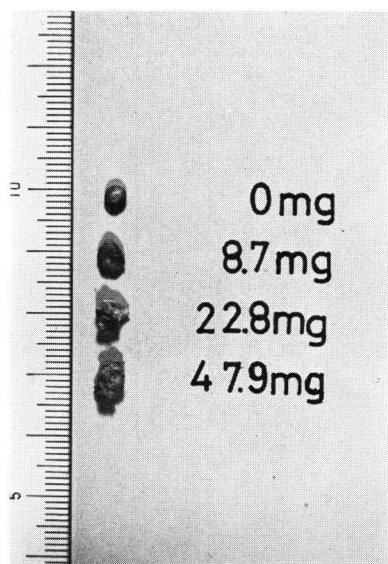


Fig. 1. Bladder stone

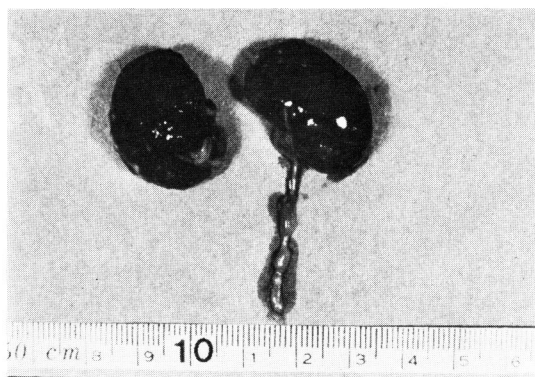


Fig. 2. Renal abscess

る (Fig. 2)。このようにして実験的に作成する膀胱結石の形成に対してニコチノヒドロキサム酸の経口投与による阻害効果を調べた。

#### 実験 1)

ラットを

- a) 無菌亜鉛挿入無治療群
- b) 汚染亜鉛挿入無治療群
- c) 汚染亜鉛挿入治療群

の3群にわけ、治療群はニコチノヒドロキサム酸 3 mg/ml を含む飲料水を術後より自由に摂取させた。平均摂取量 8.0 ml/day でニコチノヒドロキサム酸の投与量として 24 mg/day であった。各群につき尿量、尿 pH を調べ、7日目にと殺し腎所見、結石重量、尿中細菌数などを調べた。

#### 実験 2)

- a) 汚染亜鉛挿入無治療群

## b) 汚染亜鉛吸入治療群

の2群にわけ、治療群は術後2日目よりニコチノヒドロキサム酸 100 mg/kg/day を朝夕の2回分割胃ゾンデにより強制投与し、尿量、尿 pH、飲料水量、尿中ヒドロキサム酸濃度などを調べ6日目にと殺し、結石重量、腎所見、尿中細菌数、BUNなどを調べた。

ラットは Wistar 系雄性で体重 200 g 前後のものをを用いた。

吸入亜鉛玉 (120 mg~150 mg) は滅菌した後 *Proteus mirabilis* 10<sup>7</sup>/ml の細菌浮遊液に浸して汚染亜鉛玉とした。*Proteus mirabilis* は臨床分離株を用い、実験1)と2)は別の株を用いた。

尿 pH は代謝ケージにて6時間採尿後 pH メーター LABOMATE II (東芝ベックマン製) にて測定した。

結石分析は赤外線分光分析にておこなった。

BUN 測定は尿素窒素テストワコー (和光純薬) をを用いた。

細菌培養は brain heart infusion agar を用いての混釈培養法およびウリカルト (第一化学薬品製) の dip slide 法にておこなった。

腎所見は肉眼的所見および HE 染色にて顕微鏡所見によった。

## 実 験 結 果

## I. ヒドロキサム酸の尿中排泄

7種の代表的なヒドロキサム酸の尿中排泄を調べてみると Table 1 のごとくであった。アセトヒドロキサム酸が最も多く排泄され、6時間まで 28.0%、6時間より24時間まで 2.53%、24時間 total 30.5%で、次いでセリンの 8.83%、0.11%、total 8.94%、ヒスチジン-3.4%、0.02%、total 3.42% であった。ついでニコチノ-は 0.98%、0.10%、total 1.08% の排泄をみた。カプリロ-は1日量で 1.00%、グリシン-0.88%、ついでベンゾ-0.59%と少量であった。

Table 1. Urinary excretion of hydroxamic acids in rats.

Hydroxamic acid	I <sub>50</sub> μM	Dose mg/kg of rats	Number	Recovery %			Effective Index*
				0-6hr	6-24hr	Total	
Nicotino-	2.15	120	5	0.98	0.10	1.08	0.50
Benzo-	3.9	200	2	0.40	0.19	0.59	0.15
Caprylo-	0.97	40	4	0.61	0.39	1.00	1.03
Aceto-	10	100	6	28.0	2.53	30.5	3.05
Glycine-	15.5	50	2	0.64	0.24	0.88	0.057
Histidine-	21.9	100	3	3.4	0.02	3.42	0.156
Serine-	17.5	100	3	8.83	0.11	8.94	0.51

\* Effective index =  $\frac{\text{Recovery \%}}{\text{I}_{50}(\mu\text{M})}$

ヒドロキサム酸の経口投与後の尿中のウレアーゼ阻害効果をじゅうぶん得るためにはヒドロキサム酸がより多く未変化のまま尿中に排泄され、しかも阻害作用が強力なことが必要であるが、そこで効果の指標として  $\text{Effective index} = \frac{\text{Recovery \%}}{\text{I}_{50}(\mu\text{M})}$  を算出してみた。

Table 1 に示すようにアセトヒドロキサム酸が最も大きく 3.05、次いでカプリロ-の 1.03、セリン-0.51、ニコチノ-の 0.50、ヒスチジン-0.156、ベンゾ-0.15 ついでグリシン-0.057 の順であった。なお 50% 阻害 (I<sub>50</sub>) はなたまめ粉末の粗抽出液ウレアーゼを用い、一定条件下で測定したものである。

## II. ニコチノヒドロキサム酸のラット膀胱結石の形成抑制

## 実験 1)

Table 2 にラット数、尿 pH、尿量、尿中細菌数、結石重量、腎所見をまとめて示した。途中死亡したものおよび殺時膀胱尿の感染なきものは除外した。汚染亜鉛吸入無治療群 20 例中 4 例が途中死亡し、2 例が感染しておらず除外し、また治療群では 22 例中 9 例が死亡、3 例が感染せず除外した。途中で死亡したものはすべて感染の腎が認められた。

Table 2. Effect of nicotino hydroxamic acid on bladder stone.

Experiment 1						
	Number of rats	Urine pH	Urine ml	Viable cell	Stone mg (composition)	Kidney
Control	5	6.55 ± 0.40*	8.1	Sterile	< 1.0	normal
Infected	14	8.62 ± 0.30	4.7	> 10 <sup>5</sup> /ml	18.8 ± 12.6* (Struvite)	abscess (11/14)
treated	10	7.42 ± 0.50	2.4	> 10 <sup>5</sup> /ml	3.9 ± 2.1 (Struvite)	abscess (8/10)

\* Mean ± S.D.

まず無菌亜鉛吸入群 (sterile control) では結石重量は 1 mg 以下であり、尿 pH 上昇も認めなかった。汚染亜鉛吸入無治療群 (infected control) では尿 pH 9.62 ± 0.30 (Mean ± S.D. 以下略)、結石重量 18.8 ± 12.6 mg、で腎の感染は 14 例中 11 例にみられ腎膿瘍および腎盂腎炎であった。汚染亜鉛吸入治療群 (treated) では尿 pH 7.42 ± 0.50、結石重量は 3.9 ± 2.1 mg で腎の感染は 10 例中 8 例に認められた。

## 実験 2)

Table 3 に示すごとく無治療群では 11 例中 3 例が感染せず、2 例が 6 日目までに死亡した。残り 6 例について尿量 5.8 ± 4.9 ml、尿 pH は 9.10 ± 0.14 と非常に高くなり、結石重量は 32.6 ± 8.6 mg であった。腎の感染は全例に認め、腎膿瘍および腎盂腎炎であった。BUN は 69.4 ± 42.0 mg/dl と上昇した。治療群では 13

Table 3. Experiment 2 data.

untreated control						
Rat No.	Urine Volume ml	pH	Stone Wt. mg	BUN mg %	Kidney	
606	7.3	9.22	32.4	42.5	Renal abscess	
607	Expired	—	—	—	—	
608	1.8	—	32.5	43.5	Pyelonephritis	
609	1.0	—	22.0	144.1	Pyelonephritis	
101	4.0	9.14	28.2	43.5	Renal abscess	
102	Uninfected	—	—	—	—	
103	6.5	9.14	47.9	95.5	Pyelonephritis	
104	Uninfected	—	—	—	—	
105	Uninfected	—	—	—	—	
106	14.3	8.91	32.7	47.1	Pyelonephritis	
107	Expired	—	—	—	—	
M.±S.D.	58±4.9	9.10±0.14	32.6±8.6	69.4±42.0		
treated						
Rat No.	Urine ml	pH	Hydroxamic acid µg/ml	Stone Wt. %	BUN mg %	Kidney
601	10.3	7.30	8.6	0.28	10.1	30.3 Normal
602	Expired	—	—	—	—	—
603	7.8	6.96	35.5	1.42	2.9	19.5 Normal
604	Expired	—	—	—	—	—
605	4.5	7.22	23.9	0.47	8.9	60.0 Pyelonephritis
108	15.7	8.22	9.1	0.33	22.8	30.0 Pyelonephritis
109	22.8	8.43	4.9	0.44	8.7	29.0 Renal abscess
110	22.7	8.27	10.6	0.88	10.9	19.8 Pyelonephritis
111	15.7	8.52	5.9	0.40	45.9	38.4 Pyelonephritis
112	Uninfected	—	—	—	—	—
113	23.2	7.42	8.7	0.81	20.5	21.5 Normal
114	17.0	6.93	10.5	0.74	13.1	27.9 Normal
115	13.6	7.27	5.8	0.41	10.0	34.1 Normal
M±S.D.	15.3±6.6	7.65±0.68	12.3±9.7	0.62±0.25	15.4±12.2	31.1±11.7
* Recovery %						

例中2例が6日目までに死亡し1例が感染せず、残り10例については尿量  $15.3 \pm 6.6$  ml, 尿 pH  $7.65 \pm 0.68$ , 結石重量  $15.4 \pm 12.2$  mg であった。ニコチノヒドロキサム酸の尿中濃度は  $12.3 \pm 9.7$  mg/ml で24時間尿中回収率は  $0.62 \pm 0.25\%$  であった。腎の感染は10例中5

例にみられ、BUN は  $31.1 \pm 11.7$  mg/dl であった。なお結石の成分は分析したものではありません。また尿量は術後4日間の平均を示し、尿 pH は3日間の平均、ヒドロキサム酸濃度は2日間の平均値を表示した。

実験1), 2) において尿量, 尿 pH, 結石重量, 腎障害などについて、治療群と無治療群を比較してみると、尿量は実験1) で治療群 2.4 ml, 無治療群 4.7 ml で治療群のほうがやや少なく、逆に実験2) では治療群 15.3 ml, 無治療群 5.8 ml で治療群のほうが多かった。これは実験1) ではヒドロキサム酸混入の飲料水を自由摂取させたため、ニコチノヒドロキサム酸の苦味による飲料水摂取不足のためと思われる。実験2) は強制投与した群であるが逆に治療群で多いのはニコチノヒドロキサム酸の直接の作用か、腎機能障害の程度の差のためか不明である。

尿 pH は実験1) では無治療群  $8.62 \pm 0.30$  治療群  $7.42 \pm 0.51$  で明らかな差を認め ( $P < 0.01$ )、また実験2) では無治療群  $9.10 \pm 0.14$ , 治療群  $7.65 \pm 0.68$  と同様に有意の差を認めた ( $P < 0.01$ )。

結石重量については Fig. 3 に示すごとく実験1), 2) についてともに  $p < 0.01$  で明らかな差を認めた。ただし実験1) と2) とは実験方法の違いおよび用いた菌株の違いにより比較できない。

腎の感染については実験2) では腎膿瘍および腎盂腎炎の頻度に差がみとめられなかったが、障害の程度は治療群で比較的軽度であった。実験2) では無治療

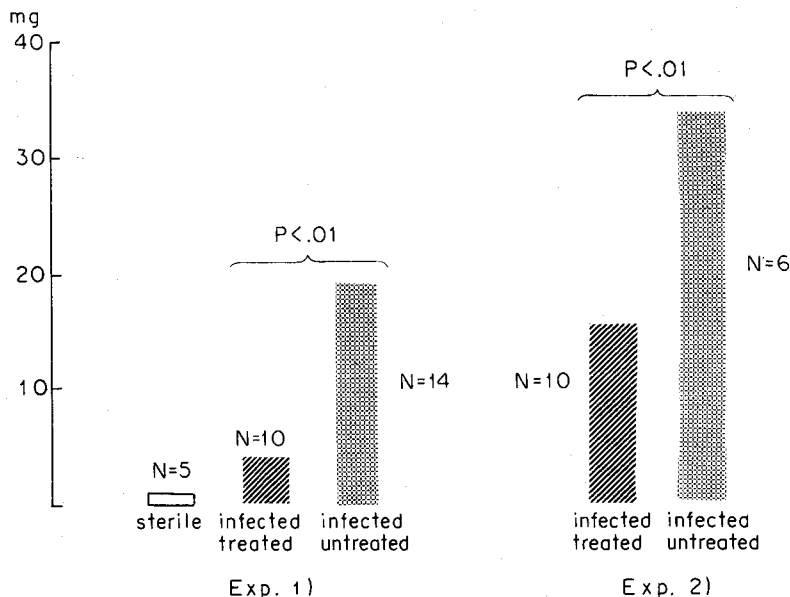


Fig. 3. Mean weight of bladder stones

群 6/6, 治療群 5/10, で差がみられた. また BUN は無治療群  $69.4 \pm 42.0$  mg/dl, 治療群  $31.1 \pm 11.7$  mg/dl で両群の差が認められた (Fig. 4).

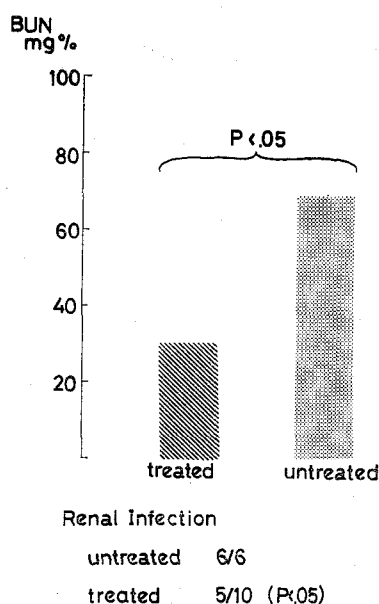


Fig. 4. Mean BUN and renal infection in experiment 2

## 考 察

リン酸塩結石は主としてウレアーゼ産生菌の感染により形成される. これはウレアーゼにより尿中の尿素が分解され, アンモニアが産生され尿 pH 上昇が生じ, このため尿中リン酸塩の溶解度が減少し, 結晶として析出するためと考えられている.

ヒドロキサム酸はウレアーゼの特異的阻害作用があり<sup>1)</sup>, 多方面で応用されはじめているが, 尿路結石の予防に対してヒドロキサム酸の利用の研究はまだあまりなされておらず, わずかに Griffith ら<sup>4,5)</sup>のアセトヒドロキサム酸での研究, 馬尿酸誘導体での Andersen の報告<sup>6)</sup>などがみられるにすぎない.

われわれはニコチノヒドロキサム酸を用い *in vitro* での感染尿のアルカリ化抑制効果を調べ, その効果が著明であることをすでに報告した<sup>2)</sup>が, 今回種々のヒドロキサム酸の尿中排泄を調べた. 尿中回収率はアセトヒドロキサム酸が最もよく 24時間約30% (Fishbein ら<sup>3)</sup>の報告では60%) であり, 次いでセリン-9%, ヒスチジン-3.4%, ニコチノ-2%であった. Effective index ではアセトヒドロキサム酸が最も大きく 3.05, 次いでカプリロ-1.03, ニコチノ-0.50 であった. この Effective index が大きいほど尿中での阻害性が大き

あり, 結石形成抑制効果が期待できる. この意味でアセトヒドロキサム酸が最適であるがアセトヒドロキサム酸には催奇形性のあることが知られており<sup>10)</sup>, 臨床に応用できない. ニコチノヒドロキサム酸はやや苦味を有するが無臭で経口投与しやすく動物実験に適しており, またこの調査の中で比較的すぐれていたため, 次にニコチノヒドロキサム酸を用いてラットの膀胱結石の形成抑制実験をおこなった. ニコチノヒドロキサム酸 100 mg/kg/day 経口投与により尿 pH 上昇の抑制, 結石形成の抑制が認められ, また同時に生ずる腎の感染および腎機能障害の程度も比較的軽度であった. 実験 1), 2) において対照群と治療群とに尿量の差がみられ, これは結石形成にあるていど影響をおよぼすであろうが投与方法の異なる実験 1) と 2) とでは対照群と治療群とで尿量は逆の結果となった. しかし結石重量の差はいずれの場合も認められ, ニコチノヒドロキサム酸の投与の効果があつたものと考えられる. ただ結石重量は実験 1) と 2) でだいぶん差があるが投与方法の違いおよび用いた菌株の違いのためかと思われる. ニコチノヒドロキサム酸には抗菌性は認められず<sup>11)</sup>, 治療群で腎の感染および腎機能障害の程度が軽度であるのはアンモニア生成抑制および結石形成抑制の結果ではないかと考えられる. このようにニコチノヒドロキサム酸 100 mg/kg/day の経口投与にてじゅうぶん効果がみられたが, 実験 2) においてニコチノヒドロキサム酸の尿中濃度は平均  $12.3 \mu\text{g/ml}$ , 回収率 0.62% (尿中排泄実験では 1.08%) と少なかった. これは代謝ケージでの尿の回収が不完全なことおよび腎機能障害による排泄低下によるものと思われる.

ニコチノヒドロキサム酸は前述のごとく尿中回収率約 1% と小さいが, これは投与された量の大部分がニコチン酸アミドやニコチン酸などに代謝されるためと考えられており<sup>12)</sup>, したがってニコチノヒドロキサム酸の尿路結石予防の利用は阻害性が強力であるが尿中排泄が少ないため局所的利用の可能性はあるが, 経口投与での利用はひとつ難点がある.

アセトヒドロキサム酸は Griffith ら<sup>4,5)</sup>によりじゅうぶんな結石抑制効果が報告されたが, 先に述べたごとく催奇形成の問題があり, これも実面的でない.

Andersen<sup>6)</sup>は馬尿酸の誘導体である p-chlorobenzenamidoacetohydroxamic acid を用い結石形成抑制実験をおこない好結果を得ているが, この物質は最近われわれが調べたところでは比較的尿中排泄もよく, 阻害性も強く尿路結石の予防剤として有望である.

ヒドロキサム酸を結石形成予防に用いるためには, 阻害性が強く尿中回収率の大きい化合物を得ることが

必要である。われわれはそのためのスクリーニングとして効果指数  $\frac{\text{recovery \%}}{I_{50}(\mu\text{M})}$  を設定し、種々のヒドロキサム酸誘導体について調べている。効果指数が大きく副作用のない化合物がえられればリン酸塩結石の予防剤として非常に有用な薬剤となるであろう。

## 結 語

ウレアーゼ阻害剤である数種のヒドロキサム酸のラットへの経口投与における尿中排泄(尿中回収率)を求めた。この結果からニコチノヒドロキサム酸を選び、その 100 mg/kg/day の経口投与によりラット膀胱結石の形成抑制効果を調べた。

1) スクリーニングした7種のヒドロキサム酸のうちでアセトヒドロキサム酸の尿中回収率がいちばん高く約30%であった。またニコチノヒドロキサム酸の尿中回収率は約1%であった。

2) ヒドロキサム酸の尿中での効果の指数として  $\text{Effective index} = \frac{\text{recovery \%}}{I_{50}(\mu\text{M})}$  を算出するとアセトヒドロキサム酸がいちばん大で 3.05 であり、ニコチノヒドロキサム酸は 0.50 であった。

3) ニコチノヒドロキサム酸 100 mg/kg の経口投与により、尿 pH の上昇も抑制され、ラット膀胱結石の形成抑制がみられた。

4) 同時に生ずる腎の感染および腎機能障害の程度もニコチノヒドロキサム酸投与により比較的軽度となった。

5) Effective index が大であり、副作用の問題がないヒドロキサム酸が得られれば、結石予防薬として非常に有用な薬剤となるであろう。

なお、本論文の要旨は1975年10月第48回日本生化学会大会1976年4月第64回日本泌尿器科学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) 小橋恭一：生化学，**44**：187，1972
- 2) 竹内秀雄・高橋陽一・吉田修・小橋恭一：泌尿紀要，**22**：115，1976.
- 3) Kobashi, K., Takebe, S., Terashima, N. and Hase, J.: J. Biochem., in press (1976).
- 4) Griffith, D. P., Musher, D. M. and Campbell, J. W.: Invest. Urol., **11**：234, 1973.
- 5) Griffith, D. P. and Musher, D. M.: Invest. Urol., **11**：228, 1973.
- 6) Andersen, J. A.: Invest. Urol., **12**：381, 1975.
- 7) Hase, J., Kobashi, K., Kawaguchi, N. and Sakamoto, K.: Chem. Pharm. Bull., **19**：363, 1971.
- 8) 小橋恭一・竹部幸子・長谷純一：薬学雑誌，**93**：1564, 1973
- 9) Fishbein, W. N. and Carbone, P. P.: Clin. Res., **12**：453, 1969.
- 10) Kreybig, T., Preussmann, R. and Schmidt, W.: Arzneimittel. Forsch., **18**：645, 1968.

(1976年11月22日受付)